



Запорізький державний медичний університет

Кафедра клінічної лабораторної діагностики

Біохімічні методи.

Імуноферментний аналіз, радіоімунний аналіз, хемілюмінесцентний аналіз

Порівняння імуноферментного, імунохемілюмінесцентного та електрохемілюмінесцентного методів детекції



Історія розвитку імуно-хімічних методів аналізу

- ▶ 60-ті: **радіоізотопні методи** (висока чутливість і специфічність);
- ▶ 70-ті: **імуноферментні методи** (покращена стабільність реагентів, можливість автоматизації);
- ▶ 80-ті: **імунохемілюмінесцентні методи** (скорочений час інкубації, збільшена чутливість);
- ▶ 90-ті: **електрохемілюмінесцентні методи.**

Імунохімічні методи

При взаємодії антигену та специфічного імуноглобуліну (АТ) утворюється високомолекулярний комплекс. Можна визначати АТ за допомогою специфічних АГ, можна визначати АГ за допомогою специфічних АТ



- 1) Методи преципітації в гелі (імунодиффузія).
- 2) Методи лігандного аналізу.
- 3) Імунотурбідиметрія.

Гомогенний і гетерогенний методи

Гетерогенний аналіз відрізняється від гомогенного тим, що в реакційній суміші є дві фази – тверда (осад, суспензія) і рідка, що дозволяє відокремити комплекс від вихідних компонентів. Найпоширеніший варіант гетерогенного аналізу - це твердофазний, коли з самого початку один з компонентів реакції фіксований на твердому носії. Широко поширений варіант ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

Визначення індивідуальних білків на основі реакції взаємодії антиген-антитіло.

При взаємодії АГ с АТ утворюється імунний комплекс, який може випадати в вигляді преципітату. Реакція преципітації була використана в методі радіальної імунодифузії, запропонована в 1964-65 гг. Манчіні Карбонара і Херемансом.

Метод радіальної імунодифузії не потребує спеціального обладнання, але він досить тривалий, не піддається автоматизації, несе певну частку суб'єктивізму.

Лігандний аналіз.

- специфічне зв'язування з лігандами як аналітичний метод починається з роботи Ялоу і Берсон, що запропонували в 1960 році метод радіоімунологічного визначення (RIA) інсуліну. Ця робота була удостоєна Нобелівської премії.

► У лігандному аналізі виділяють три компоненти:

- 1) АНАЛІТ - визначувана речовина. Вона може міститися в аналізованому матеріалі, може бути додана як калібратора і т. д..
- 2) ЛІГАНД - речовина вибірково зв'язується з аналітом.
- 3) МІТКА - легко визначуване з'єднання, що додається в аналітичну систему для вимірювання кількості аналіту.

ЕТАПИ:

1. Взаємодія аналіту з лігандом.
2. Формування міченого комплексу.
3. Вимірювання сигналу (визначення кількості мітки).

ОСНОВНІ АНАЛІТИЧНІ ВАРІАНТИ :

- ▶ 1.Прямі - визначається кількість комплексу аналіт - ліганд.
При збільшенні концентрації аналіту сигнал зростає.
- ▶ 2. Непрямі - визначається кількість вільних валентностей ліганда, що залишилися.

Імуноферментний аналіз

Метод визначення антигенів і антитіл, заснований на визначенні комплексу антиген-антитіло за рахунок введення в один із компонентів реакції **ферментативної її мітки** з подальшою її детекцією за допомогою відповідного субстрату, що змінює своє забарвлення.

Імуноферментний аналіз

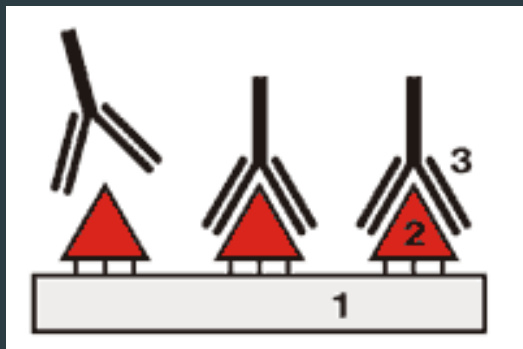
Існує безліч варіантів постановки ІФА, з яких найбільш практичне значення отримав гетерогенний твердофазний імуноферментний аналіз. Використання твердої фази дозволяє спростити процес поділу компонентів реакції за рахунок іммобілізації одного з компонентів на твердій фазі і видалення субстанцій, що не беруть участь у реакції.

Імуноферментний аналіз

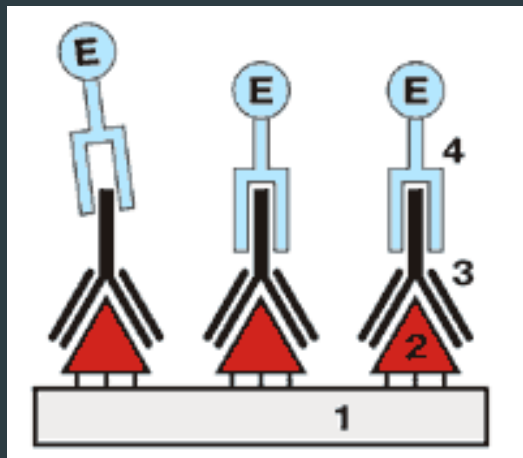
Для ферментативної мітки кон'югата можуть бути застосовані різноманітні ферменти: пероксидаза хрону, лужна фосфотаза, бета-галактозидаза, глюкозооксидаза та ін. У всіх комерційних тест-системах використовується пероксидаза хрону, вибір якої визначається її високою питомою каталітичною активністю, доступністю, стабільністю, простотою детекції.

Імуноферментний аналіз

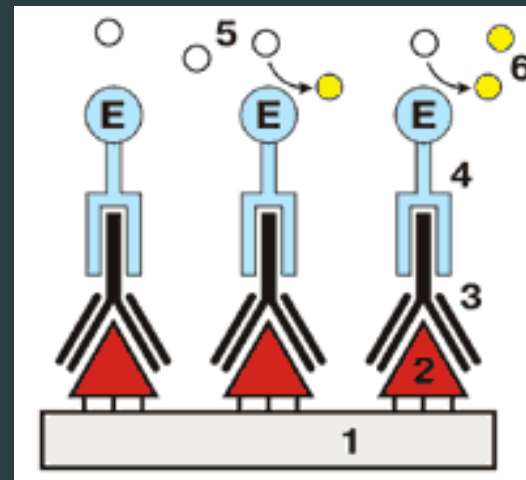
Етапи ІФА:



Взаємодія аналіту
з лігандом



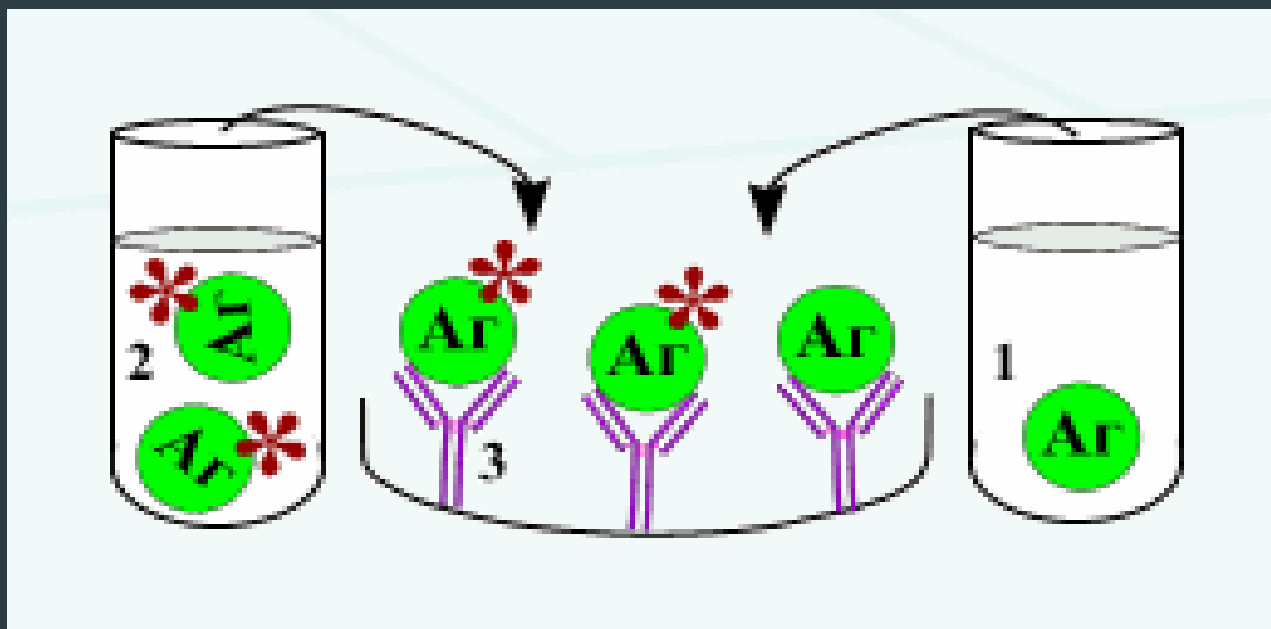
Формування міченого
комплексу



Вимірювання сигналу

Конкурентний ІФА для визначення антигенів

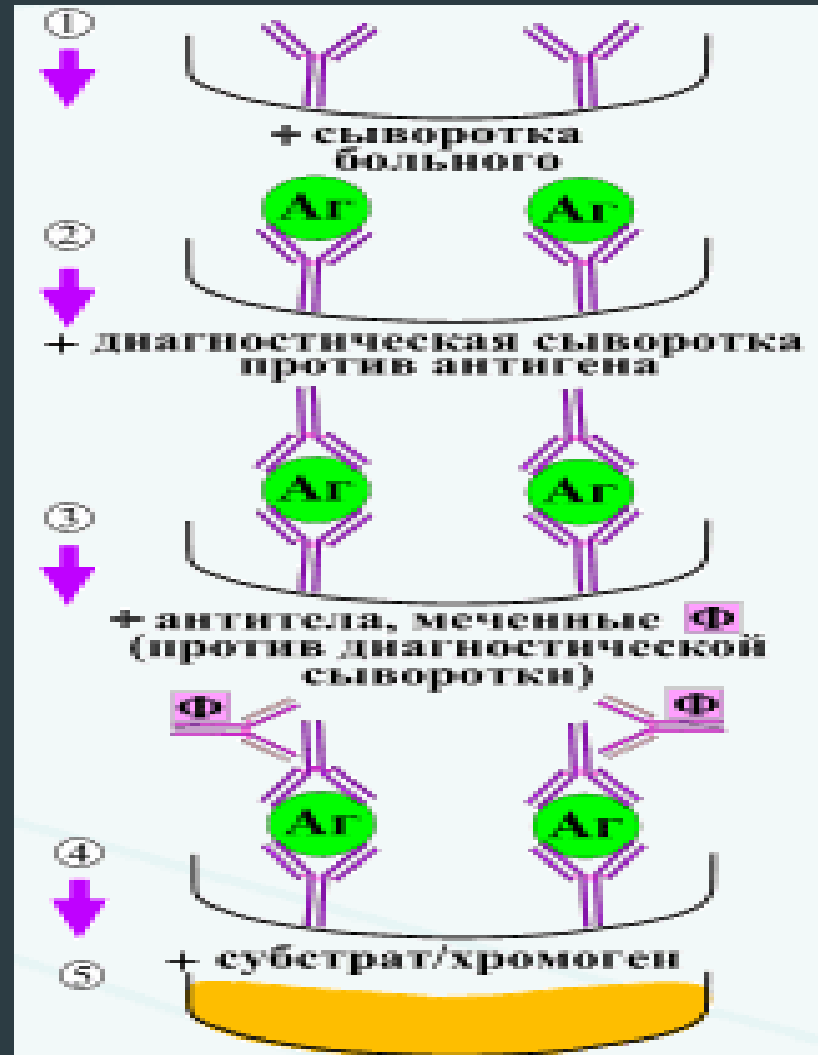
Шуканий антиген(1) і мічений ферментом антиген(2) конкурують один з одним за антитіла (3), сорбовані на твердій фазі.



- Визначення АТ у сироватці хворого (у лунках планшеток з сорбованим АГ (прямий ІФА))



Визначення АГ в сироватці хворого (у лунках планшеток з сорбованих АТ)прямий ІФА



Імуноферментний аналіз - це:

- ▶ Чутливість, що дозволяє виявляти концентрації до 0,05 нг/мл;
- ▶ Можливість використовувати мінімальні обсяги досліджуваного матеріалу;
- ▶ Стабільність при зберіганні всіх інгредієнтів, необхідних для проведення ІФА (до року і більше);
- ▶ Простота проведення реакції;
- ▶ Наявність як інструментального (в якісному і кількісному варіанті), так і візуального обліку;
- ▶ Можливість автоматизації всіх етапів реакції;
- ▶ Відносно низька вартість діагностичних наборів.

Імунохемілюмінесцентний метод



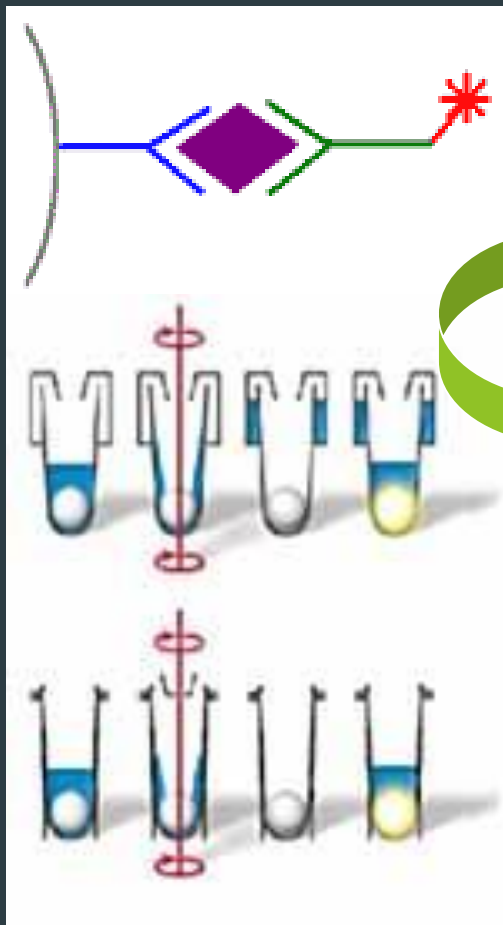
Імунохемилюмінесцентний метод

- ▶ Аналітична чутливість-
(ТТГ третьої генерації - 0,002 IU/ml.
ПСА третьої генерації - 0,003 ng/ml.);
- ▶ Продуктивність - до 120 тестів на годину;
- ▶ Автоматичне розведення для деяких тестів;
- ▶ Кількість реагентів, що одночасно знаходяться на борту - 12;
- ▶ Час виконання дослідження - 42 (72) хвилини в залежності від виду тіста.

Імунохемілюмінесцентний метод

Змішування та інкубація

До складу входять пробірки зі спеціальними кульками, покриті антитілами або антигеном, які використовуються в якості твердої фази реакції. Проба автоматично вноситься у пробірку, що містить кульку. Додається кон'югат, мічений ферментом лужної фосфатази.



Промивка

Для видалення неспецифічних компонентів реакції використовується унікальна система автоматичної промивки.

Детекція

Додавання хемілюмінесцентного субстрату, який взаємодіючи з лужною фосфатазою виділяє кванти світла.

Електрохемілюмінесцентний метод



Електрохемілюмінесцентний метод

Метод заснований на детекції емісії світла, що виникла під впливом електричного поля.

Мітка - рутенієвий комплекс, надзвичайно стабільна водорозчинна сіль.

Рутенієвий комплекс здатний випромінювати світло на поверхні електрода при подачі на нього напруги (світіння досягає максимуму за доли секунди).

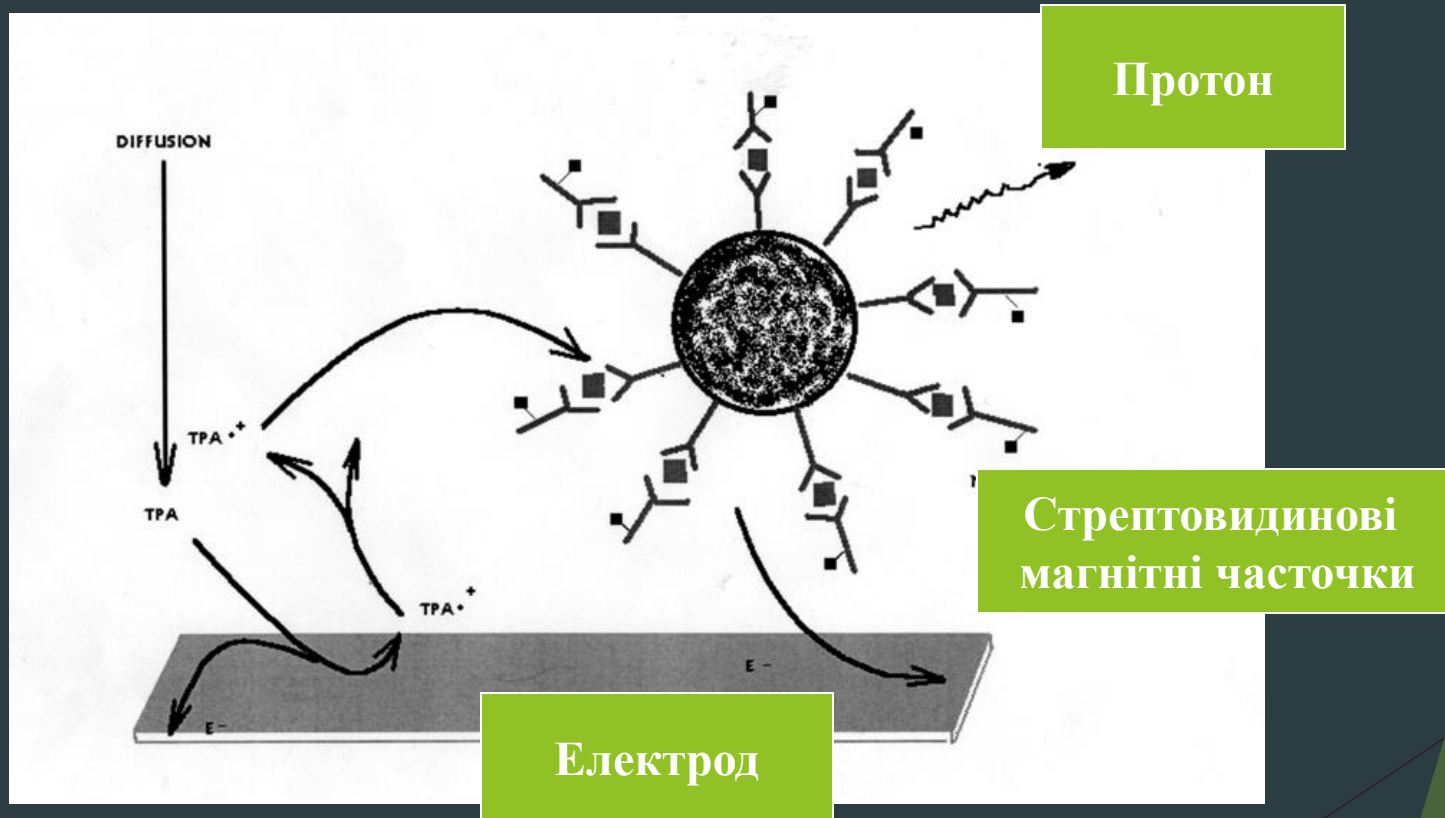
Електрохемілюмінесцентний метод

- ▶ 1-а інкубація. Проба + біотинування МА+ друге МА, позначене рутенієвим комплексом реагують з утворенням "сендвіч"-комплексу.
- ▶ 2-а інкубація. Додавання мікрочастинок, покритих стрептовідином зв'язування комплексу на твердій фазі за рахунок взаємодії між біотином і стрептовідином.
- ▶ Реакційна суміш подається у вимірювальну кювету, де мікрочастинки притягуються магнітом на поверхню електрода. Незв'язані речовини потім видаляються за допомогою буфера. Після цього подача напруги на електрод індукує хемілюмінесцентне випромінювання, яке вимірюється фотопомножувачем.

Електрохемілюмінесцентний метод

- ▶ Висока стабільність рутенієвої мітки (ферменти не використовуються, що значно підвищує стабільність реакції);
- ▶ Швидкість і надійність виникнення світлового сигналу;
- ▶ Висока -аналітична чутливість;
- ▶ В якості твердої фази використовуються найдрібніші (2,8 мкм), покриті стептовидином магнітні частинки. Частинки знаходяться у вигляді суспензії, забезпечуючи велику поверхню для іммобілізації імунних комплексів, що значно прискорює реакцію.

Електрохемілюмінесцентний метод



Електрохемілюмінесцентний метод

- ▶ Короткий час інкубації. (9-18 хвилин).
- ▶ Аналітична чутливість-
(ТТГ - 0,005 IU/ml.,
ПСА - 0,005 ng/ml.);
- ▶ Широкий діапазон вимірювання;
- ▶ Продуктивність приладу до 90 аналізів в годину;
- ▶ Можливість паралельного тестування - до 15 тестів одночасно;
- ▶ Автоматичне розведення.

Зіставлення методів що застосовуються для гормональних досліджень

Метод детекції	Чутливість (моль/л)	Переваги методу	Недоліки методу
Турбідиметрія,Нефелометрія (ІДЦ)	~ 10-6	Можливість проведення аналізу в б/х пробі	Вузький спектр показників
ІФА плащечна технологія (ІДЦ)	10-9 - 10-6	«Відкритість» системи	Концентрація гормонів нижче чутливості системи
ИФА пробірочна технологія (ІДЦ)	10-9 - 10-6	Можливість швидкого отримання результату (1анализ)	Обмежений спектр, закрита система
Флюоресценція (ІДЦ)	10-9 - 10-8	Можливість швидкого отримання результату (1анализ)	Ефект гасіння флуоресценції, закриті технології
Флюоресценція з генерацією сигналу (ІДЦ)	10-16 -10-9	Дозволяє проводити вимірювання в широкому діапазоні концентрацій	Закриті технології, обмежений спектр показників
Люмінісценція (ІДЦ)	10-9 - 10-8	Дозволяє проводити вимірювання в широкому діапазоні концентрацій	Закриті технології, обмежений спектр показників
Люмінісценція с генерацією світла (ІДЦ)	10-16 -10-10	Вимірювання в широкому діапазоні концентрацій, включаючи мінімальні	Закриті технології, обмежений спектр показників

Групи методів лабораторної діагностики

➤ Прямі

виявляють інфекційний агент

➤ Непрямі виявляють відповідь організму на інфекційний агент

Непрямі методи

➤ Всі серологічні реакції – РСК, РТГА, РПГА, ІФА і т. д.

➤ Безперечні плюси

- відповідь з'явиться незалежно від місця локалізації процесу
- дають уявлення про відповіді організму на ПБА
- можна визначити стадію захворювання

➤ Мінуси

- підходять лише для інфекційних захворювань
- наявність «серологічного вікна»
- мала інформативність у випадку імунодефіциту
- цілий ряд інфекцій зустрічається і у здорових пацієнтів

Прямі методи

- Мікроскопія
- ІФА на антигени
- ПЛР
- Культуральний метод

Особливості прямих методів

- Лікар повинен знати стадії перебігу і уявляти, де в яку стадію інфекційний агент може бути.
- Важливо грамотне взяття матеріалу.
- Треба пам'ятати, що поняття «ІНФІКОВАНІСТЬ» і «ІНФЕКЦІЙНИЙ ПРОЦЕС» - не тотожні.
- Негативний результат при некоректному методичному підході не виключає факту захворювання.

Вибір серед прямих методів лабораторної діагностики

Світлова мікроскопія

Ряд мікроорганізмів не візуалізується;
Схожість морфотипів;
Суб'єктивність оцінки;
Висока швидкість проведення аналізу.

Бак. посів

Труднощі транспортування та зберігання матеріалу до дослідження;
Ряд мікроорганізмів важко або неможливо культивувати;
У процесі росту втрачається співвідношення;
Є чутливість до а/б;
Низька швидкість.

ПЛР

Скринінг – ТАК чи НІ;
Кількісна оцінка;
Динамічні спостереження;
Немає чутливості до а/б;
Висока швидкість.

ІФА

Доступність для лабораторії;
Швидкість отримання результату;
Якісна або кількісна оцінка;
Динамічне спостереження при кількісному визначенні.

Тим не менш :

- Жоден метод не є абсолютним, що виключає всі інші
- Краще всього комбінувати прямі методи з непрямими
- Результати лабораторії лікар повинен зіставляти з клінічною картиною

Хроматографічні методи дослідження

- ▶ Аффінна ЖХВД; Тонкошарова хроматографія Техніка ТШХ. Приготування пластинок. Нанесення препаратів. «Прояв» пластинок, виявлення плям або смуг (денситометрія).
- ▶ Метод трудомісткий, токсичний.



Paragon-Appraise





**Система капілярного електрофорезу
CAPILLARYS 2 (SEBIA)»**
Інноваційна технологія поділу та аналізу
білкових фракцій сироватки крові, сечі
Виробник: SEBIA ELECTROPHORESIS (Франція)

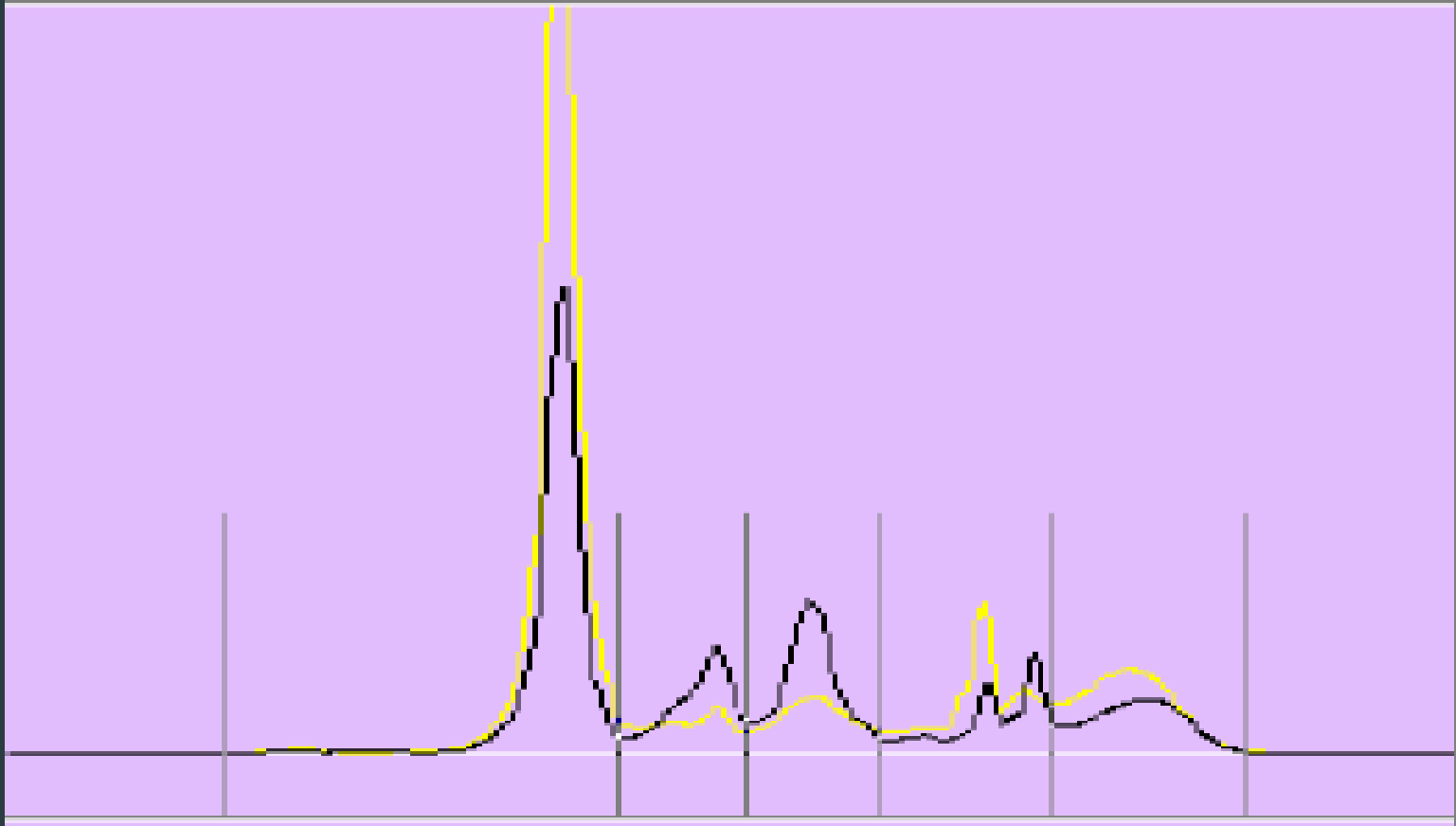


**Система капілярного електрофорезу
V8 – восьмиканальна
автоматизована система капілярного
електрофорезу для розділення і
аналізу білків, цільної крові,
сироватки і сечі.
Виробник: HELENA BIOSCIENCES
(велика Британія)**

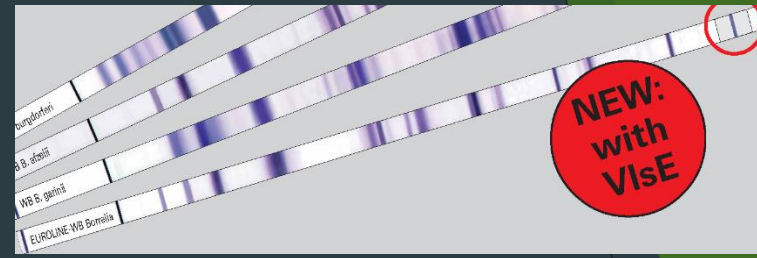


**Система клінічного капілярного електрофорезу
PARAGON CZE® 2000**
для поділу і аналізу білкових фракцій сироватки
крові, сечі і спинномозкової рідини
Виробник: ("Beckman-Coulter", США)

Функція накладання контрольної кривий



Експрес-діагностика



- ▶ Імуноблотінг;
- ▶ Діагностичні набори для клінічної хімії;
- ▶ Латекс-тести для якісного та напівкількісного аналізу;
- ▶ Імунохроматографічні тести на картриджах та тест-смужках;
- ▶ Смужки для аналізу сечі.

Переваги експрес-методів

- ▶ Аналіз без доставки до КДЛ;
- ▶ Отримання результатів через 2-20 хв.;
- ▶ Відсутність дорогих приладів при якісному і напівкільсному аналізу;
- ▶ Використання простих приладів-рідерів для кількісних досліджень;

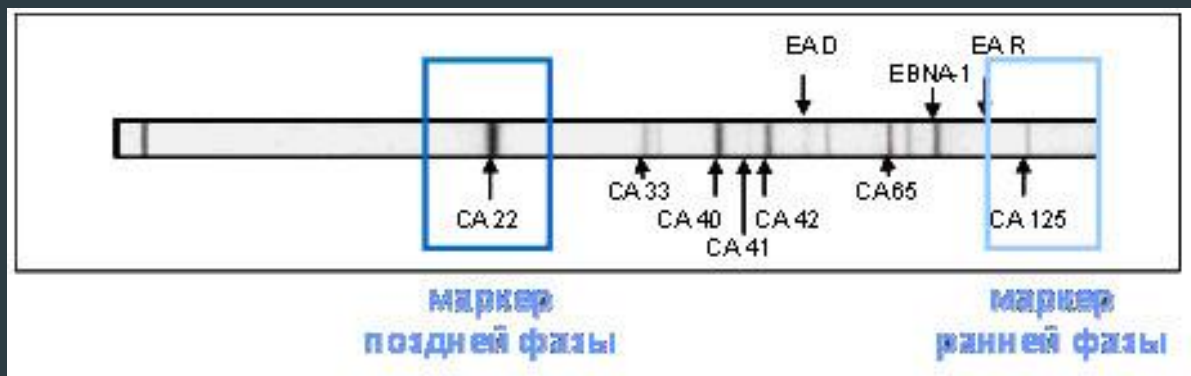
Імуноблотинг

Імуноблотинг - високочутливий метод виявлення білків, заснований на поєднанні електрофорезу та ІФА або РІА.

Метод виявлення антитіл до окремих антигенів збудника заснований на постановці ІФА на нітроцелюлозних мембранах, на які у вигляді окремих смуг нанесені специфічні білки, розділені гель-електрофорезом. Якщо є антитіла проти певних антигенів - з'являється темна лінія у відповідному локусі стрипа.

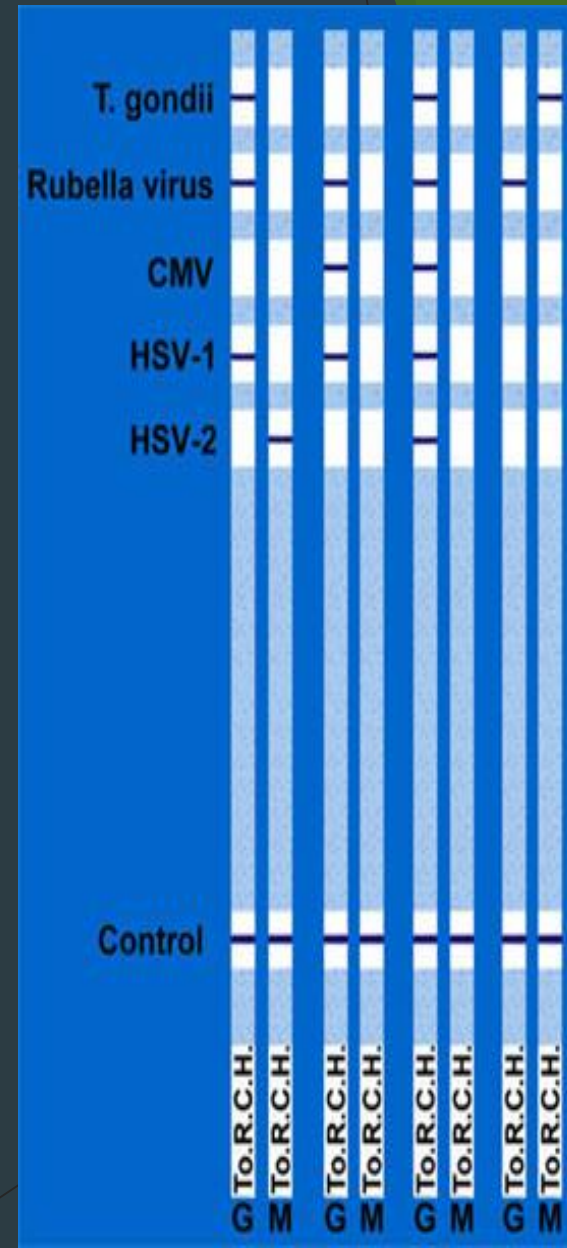
Імуноблотинг: види наборів

Вестерн-блот: Набори містять тестові стрипи-мембрани з електрофоретически розділеними нативними антигенами відповідних інфекційних агентів, тобто антигени розташовуються в порядку молекулярної маси



Імуноблотинг: види наборів

Лайн-блот: на тестові стрип-мембрани нанесені тільки клінічно значущі антигени (нативні, синтетичні або рекомбінантні) в певному порядку. Такий підхід використовується при диференціальній діагностиці декількох інфекцій на одному стрипі



Імуноблотинг: види наборів

Southern Blot - розділення ДНК

Northern Blot - розділення РНК

Western Blot - розділення білків

SOUTHERN BLOT - Процедура була розроблена Е. М. Southern і в її основі лежить перенесення відрізків ДНК з поверхні гелю ПААГ після поділу електрофорезом на нітроцелюлозний фільтр під впливом потоку сольового елюенту, що викликається його всмоктуванням в шари фільтрувального паперу.

SOUTHERN, WESTERN, NORTHERN BLOTS

На практиці це використовується для порівняння геномів окремих осіб з метою виявлення патологічних змін в послідовності нуклеотидів або встановлення родинних відносин. Патологічна заміна ряду нуклеотидів в зоні рестрикції призводить до її зникнення і зміщення смуги щодо смуг пацієнтів в нормі.



Безприладові тест-системи ІФА

IMMUNOCOMB ORGENICS

Оригінальна модифікація твердофазного імуноферментного аналізу на гребінках, реалізована в наборах «Імунокомб», не вимагає використання додаткового обладнання і розчинів (набір повністю укомплектований і готовий до використання).

В якості досліджуваного матеріалу застосовується сироватка або плазма крові, у виняткових випадках - цільна кров.

Один набір «Імунокомб» розрахований на 36 визначень.

Результати можна отримати через 40 хвилин.

IMMUNOCOMB ORGENICS

Зубці пластикового гребеня сенсibiliзовані відповідними антигенами або антитілами. Клітинки ванночок заповнені готовими розчинами кон'югату, промивальними буферами і барвником

Облік результатів – візуальний (за допомогою CombScale) або повністю автоматизований на приладі CombScan.



Латекс-тести

- ▶ Скринінг-тести для діагностики ревматоїдних захворювань;
- ▶ Для виявлення інфекційних захворювань (кандидоз, інфекційний мононуклеоз, токсоплазмоз, сифіліс);
- ▶ Фертильність і безпліддя (ХГЛ, анти-овариальні АТ, антиспермальні АТ);

Реакція аглютинації

Ревматоїдний фактор «RF Direct Latex»

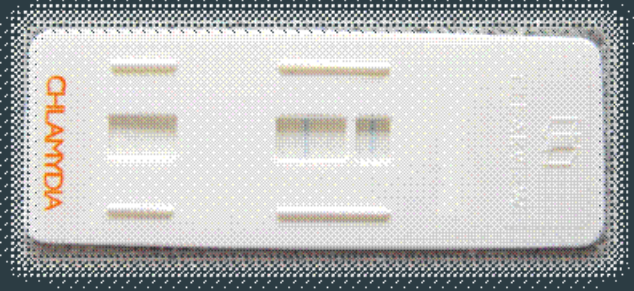
Виробник - VEDA.LAB – Франція

РФ латекс-реагент – є суспензією полістиролів частинок, сенсibilizирован-них гамма-глобуліном. При змішуванні реагенту зі зразком сироватки, що містить ревматоїдний фактор, відбувається реакція аглютинації, яка легко реєструється візуально. Наявність або відсутність видимої аглютинації вказує на наявність або відсутність РФ в тестованому зразку.

Імунохроматографічні тести

- ▶ Діагностика гепатитів, статевих інфекцій, грипу А і Б, інфекції ШКТ, туберкульозу, малярії, інших інфекцій, в тому числі і torch-інфекцій.
- ▶ Скринінг вродженого гіпотиріозу (неонатальний ТТГ), виявлення гормональної дисфункції щитоподібної залози (ТТГ), проблеми вагітності (ХГЛ, ЛГ, ФСГ), діагностика патології судин (міоглобін, Д-димер, серцевий тропонин і т. д.).
- ▶ Онкомаркери (ПСА, АФП, прихована кров у фекаліях і т. д.).
- ▶ Наркотичний контроль (Барбітурати, марихуана, Екстазі, опіати і т. д.)

Імунохроматографія



В реакції використовують антитіла до шуканого антигену, адсорбовані на мікрочастках (пофарбований латекс або частинки колоїдного золота), і антитіла до того ж антигену, іммобілізовані у вигляді смуги на хроматографічному папері. Крім того, у цій реакції є внутрішній контроль (антивидові антитіла, також закріплені у вигляді смуги на хроматографічному папері).

Принцип дії імуно-хроматографічного планшета



Тест-смужки для аналізу сечі



- ▶ Діагностика декомпенсованій стадії ЦД, що супроводжується кетоацидозом та ускладнення ренопатії;
- ▶ Діагностика нефрологічних захворювань;
- ▶ Тривалість аналізу 5-10 хв., висока чутливість та специфічність, вбудований контроль якості, можливість тестувати різні типи біологічних рідин.

Тест-смужки для аналізу сечі

Тестові поля являють собою папір, просочену стандартною кількістю необхідних для реакції компонентів, які попередньо були стабілізовані за допомогою висушування. Ці компоненти можуть бути індикаторами, ферментами або іншими додатковими реагентами. При взаємодії з досліджуваною біологічною рідиною реагенти розчиняються і вступають в реакцію, яка проявляється забарвленням різної інтенсивності і пропорційна концентрації досліджуваного параметра.

Смужки для аналізу сечі

контролюють:

- ▶ 1. порушення вуглеводного обміну: глюкоза, кетонові тіла
- ▶ 2. захворювання печінки і жовчовивідних шляхів та гемолітичні стани: уробіліноген, білірубін
- ▶ 3. патологію нирок та урогенітального тракту: відносна щільність, рН, нітрити, білок, лейкоцити, кров (еритроцити та гемоглобін).

Можливе застосування відеоцифрових комплексів на базі сканерів EPSON для реєстрації аналізів з використанням спеціальних програм.

Можливості програм :

- ▶ **Отримання первинного зображення всіх тестів;**
- ▶ **Контрастування та збільшення зображення;**
- ▶ **Зіставлення зображень зразків з контролем;**
- ▶ **Визначення порогу для дискримінації позитивних і негативних зразків;**
- ▶ **Отримання об'єктивних цифрових значень, що характеризують інтенсивність реакції і візуальне представлення результатів.**

Дякую за увагу!